

# Rapport du projet GANODIV : 15 Janvier 2011

**Caractérisation moléculaire de la biodiversité fongique et identification précoce des champignons associés au phénomène de dépérissement des palmiers à huile, en particulier *Ganoderma boninense*.**



**Alba Zaremski**

**Hubert de Franqueville**

**Frédéric Breton**

## **Première Partie**

1. Introduction:
2. Objectif du projet
3. Travaux réalisés pour atteindre cet objectif
4. Méthodologie
  - 4.1. Matériel biologique
  - 4.2. Méthodes
    - 4.2.1. Extraction de l'ADN total
    - 4.2.2. Révélation des ADN sur gel d'agarose
    - 4.2.3. Quantification des ADN extraits
    - 4.2.4. La PCR : Polymerase Chain Reaction
    - 4.2.5. Séquençage
    - 4.2.6. Les critères de ressemblance : Analyse des séquences par comparaison avec les banques de données – BLAST
5. Résultats
  - 5.1. Extraction des ADN totaux.
  - 5.2. Amplification des ITS
  - 5.3. Analyse des séquences par comparaison avec les banques de données – *BLAST*
6. Conclusion
7. Evolutions du projet et perspectives

## **Deuxième Partie**

Les principaux travaux et les principales dépenses engagées en 2010

## **Liste de figures**

Figure 1 : Températures et temps appliqués aux différentes phases du programme de PCR appliqué à l'amplification des ITS de champignons.

## **Liste des tableaux**

Tableau 1 : Liste des 111 échantillons avec leur numéro d'identification et l'origine géographique

Tableau 2 : Concentration en ADN exprimée en ng/ $\mu$ L.

Tableau 3 : Résultat de la recherche de similarité des séquences nucléotidiques qui ont donné la même espèce et le même genre de champignon pour la séquence la plus proche.

Tableau 4 : Echantillons d'Indonésie-Missions septembre 2010

## **Liste des annexes**

Annexe 1 : Protocoles mis en place pour l'extraction des ADN totaux

# Première Partie

## 1- Introduction:

*Ganoderma boninense*, champignon du sol et agent de la pourriture basale du stipe, dévaste des milliers d'hectares de palmiers à huile en Asie du Sud-est. Il commence à provoquer d'importants dégâts en Afrique centrale et constitue une menace potentielle pour les plantations d'Amérique latine, dont certaines sont déjà atteintes. Le développement de cette menace repose en premier lieu sur le nombre de cycles successifs de culture du palmier à huile sur une même zone.

A ce jour, aucune information n'est disponible sur la diversité et la caractérisation moléculaire de champignons associés au phénomène de dépérissement des palmiers à huile. Ce projet apparaît comme une réponse à ce besoin d'information incontournable sur la biodiversité globale et mondiale de champignons associés au phénomène de dépérissement des palmiers à huile.

Ainsi, il convient de mettre en œuvre la constitution d'une collection de souches de référence de *Ganoderma boninense* basée sur les critères classiques de classification (mise en culture, anatomie, morphologie, etc.) et sur des critères moléculaires (extraction d'ADN, séquençage, phylogénie).

Ce travail consistera à isoler et purifier au laboratoire (culture in vitro sur milieux, en France ou en Indonésie) les champignons responsables des dégradations observées sur le terrain et, également, ceux présents dans le proche environnement (souche forestière, par exemple) ou ceux encore ne provoquant pas de symptômes sur plusieurs années (des palmiers d'aspect sain mais porteurs de carpophores sont repérés en Indonésie).

Ces travaux seront réalisés à partir des champignons en phase active de croissance (carpophore, mycelium). Les souches de cette collection seront maintenues en culture dans les différents laboratoires. La conservation classique par réfrigération, la cryoconservation et la lyophilisation seront évaluées parallèlement par les laboratoires.

## 2- Objectif du projet

Une collection de *Ganoderma boninense*, une fois établie, permettra d'acquérir une meilleure connaissance des principales fonctions impliquées dans le développement, le fonctionnement et l'adaptation à l'environnement des champignons décomposeurs du palmier à huile.

Elle permettra de valider la fiabilité du diagnostic (polymorphisme par exemple lié à l'origine géographique). Elle générera des travaux éclairants et innovants sur l'évolution adaptative des champignons dégradant le stipe du palmier à huile à partir des phylogénies obtenues. Enfin, elle servira à analyser et caractériser « l'agressivité » et « la virulence » des souches.

Ces recherches visent également à l'identification moléculaire d'une espèce fongique sans critère morphologique, c'est-à-dire au premier stade de l'infestation du palmier.

### 3- Travaux réalisés pour atteindre cet objectif

Les différentes tâches pour constituer cette collection de souches de référence de *Ganoderma boninense* basée sur les critères classiques de classification et sur des critères moléculaires sont les suivantes :

- Prospection et Collecte des champignons sur les différents sites de plantations et dans l'environnement proche.
- Isolement en culture pure, production de mycélium
- Caractérisation morphologique, anatomique, écologique, chimique
- Mise en collection de souches pures des champignons de dépérissement des palmiers à huile
- Mises au point des techniques de caractérisations moléculaires
- Extraction et purification de l'ADN du champignon à partir de carpophores, de mycélium, de palmier infesté, souches pures, etc...
- Optimisation de l'amplification de l'ADN et du séquençage
- Mise au point et standardisation des méthodes moléculaires
- Construction de la banque de données moléculaires à partir de l'ADN de carpophores, de mycélium, de palmier infesté, de souches pures, etc...

## 4. Méthodologie

### 4.1. Matériel biologique

Cette étude a été réalisée sur 111 échantillons issus de tissus frais et anciens et de fructifications de *Ganoderma*. Ces échantillons, pour la plupart lyophilisés, provenant des plantations de palmier à huile en Indonésie sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Liste des 111 échantillons avec leur numéro d'identification et l'origine géographique.

Référence des échantillons et Origine
DIV : III Block 53 2 Maret 2010
DIV : III Block 53 2 Maret 2010
DIV : III Block 53 20-03-10 (1)
DIV : III Block 53 20-03-10 (2)
DIV : III Block 42
DIV : III Block 42 2 Maret 2010
DIV II Block 38 2 Maret 2010
DIV II Block 38 20-03-2010 (1)
DIV II Block 38 20-03-2010 (2)
DIV III Block 58 20-03-2010 (1)
DIV III Block 58 20-03-2010 (2)
DIV III Block 39 20-03-2010 (1)
DIV III Block 39 20-03-2010 (2)
DIV III Block 39 20-03-2010 (3)
DIV III Block 39 20-03-2010 (4)
DIV II Blok 43
DIV II Blok 43
DIV II Blok 43 20-03-2010 (1)
DIV II Blok 43 20-03-2010 (2)

<i>DIV II Blok 43 20-03-2010 (3)</i>
<i>DIV II Blok 43 20-03-2010 (4)</i>
<i>86200 (1)</i>
<i>86200 (2)</i>
<i>86200 (3)</i>
<i>84200 (1)</i>
<i>84200 (2)</i>
<i>84200 (3)</i>
<i>88200 (1)</i>
<i>88200 (2)</i>
<i>88200 (3)</i>
<i>85200 (1)</i>
<i>85200 (2)</i>
<i>85200 (3)</i>
<i>DIV : III Blok 44</i>
<i>DIV : III Blok 44</i>
<i>DIV : III Blok 44</i>
<i>DIV : III Blok 44 20-03-2010 (1)</i>
<i>DIV : III Blok 44 20-03-2010 (2)</i>
<i>DIV : III Blok 44 20-03-2010 (3)</i>
<i>DIV : III Blok 44 20-03-2010 (4)</i>
<i>DIV : III Blok 44 20-03-2010 )</i>
<i>I 5</i>
<i>I 7</i>
<i>I 8</i>
<i>I 9</i>
<i>I 10</i>
<i>I 13</i>
<i>I 15</i>
<i>I 16</i>
<i>I 21</i>
<i>I 22</i>
<i>I 24</i>
<i>I 25</i>
<i>I 28</i>
<i>I 29</i>
<i>I 30</i>
<i>I 31</i>
<i>I 32</i>
<i>I 35</i>
<i>I 39</i>
<i>I 41</i>
<i>I 43</i>
<i>I 45</i>
<i>I 47</i>
<i>I 48</i>
<i>I 49</i>

<i>I 50</i>
<i>I 51</i>
<i>I 52</i>
<i>I 53</i>
<i>I 54</i>
<i>I 56</i>
<i>I 57</i>
<i>I 58</i>
<i>I 60</i>
<i>I 62</i>
<i>I 63</i>
<i>I 65</i>
<i>I 73</i>
<i>I 75</i>
<i>I 80</i>
<i>H70/11 TSSR</i>
<i>H50/3 TSS H/R</i>
<i>R SS P3 B1</i>
<i>G 12</i>
<i>G 13</i>
<i>B 1</i>
<i>NJ</i>
<i>NJ 2</i>
<i>D</i>
<i>D 511</i>
<i>P</i>
<i>264 03Maret 2010</i>
<i>Mono G</i>
<i>85200 USR 1 Steem Tss</i>
<i>33</i>

## 4.2. Méthodes

### 4.2.1. Extraction de l'ADN total

La maîtrise de l'extraction de l'ADN fongique est indispensable pour une bonne identification du champignon *Ganoderma* à partir de tissus frais et anciens, et des fructifications de *Ganoderma* dans les échantillons à analyser.

Dans cette étude, trois méthodologies seront testées et comparées, afin d'extraire un maximum de matériel fongique, tout en limitant l'extraction de composés naturels des échantillons (tissus anciens, contaminants, etc...) pouvant perturber l'analyse moléculaire. En effet, limiter l'extraction des pigments ou tanins des tissus infestés est un point à maîtriser pour l'optimisation de la méthode.

Le protocole mis en œuvre en combinant ces trois techniques est présenté en annexe 1.

#### 4.2.2. Révélation des ADN sur gel d'agarose

Les produits d'extraction sont visualisés par électrophorèse sur gel. Cette étape s'effectue à l'aide d'un gel d'agarose à 1% auquel sont ajoutées trois gouttes de bromure d'éthidium (BET) à 0,5 µg/ml (5 µl d'ADN mélangé à du bleu de charge (glycérol 30 %, du bleu de bromophénol 0,25 %, EDTA 10mM, à pH 8) sont déposés dans les puits du gel). La migration est réalisée à 100 Volts pendant une heure. La migration terminée, l'ADN, rendu visible par le BET est révélé sous UV.

#### 4.2.3. Quantification des ADN extraits

Cette étape est réalisée en utilisant le spectrophotomètre Nano Drop ND-100. Il mesure la concentration et la pureté de l'ADN extrait avec 2µl d'échantillon. L'indice de pureté est calculé grâce aux rapports des mesures de l'absorbance à 260 et 280 nm. Ce rapport 260/280 doit se rapprocher de 1,8 pour qualifier l'échantillon de pur. Des valeurs plus petites indiqueraient la présence d'impuretés ou de protéines absorbant aux environs des mêmes longueurs d'ondes.

#### 4.2.4. La PCR : Polymerase Chain Reaction

##### *Principe*

C'est une réaction enzymatique en chaîne qui permet l'amplification d'une région spécifique de l'ADN. La PCR utilise deux oligonucléotides (séquences courtes d'ADN) qui servent d'amorce à une enzyme la Taq DNA polymérase thermostable qui utilise des dNTPs (ATP, TTP, GTP, CTP) comme substrat.

La PCR est un ensemble de cycles thermiques répétés n fois :

*La dénaturation* : Elle s'effectue par chauffage, au-dessus de la température de fusion ( $T_m$ ) de l'ADN. Elle provoque la rupture des liaisons non covalentes établies entre les bases (3 liaisons hydrogène entre G-C et 2 entre A-T). On obtient un ADN simple brin orienté 3'-5'.

*L'hybridation* : La température est abaissée progressivement sous la  $T_m$ . Dans ces conditions, les amorces se fixent sur le brin d'ADN matrice dont elles sont complémentaires. Les deux amorces sont placées de part et d'autre de la région à amplifier. La distance entre les deux amorces définit la taille de la région amplifiée.

*L'extension* : Les oligonucléotides servent d'amorce à la Taq Polymérase qui synthétise un brin complémentaire du brin matriciel en intégrant spécifiquement les dNTPs complémentaires correspondants.

L'amplification est réalisée dans un volume réactionnel de 50 µL contenant 5 µL de matrice d'ADN (50 ng d'ADN), 4µl dNTP, 10 µL de tampon 10 X, 0,75 µL de tampon  $MgCl_2$  (25 mM), 2 µL de chaque amorce (20 pmol/µL), 0,3 µL de Taq polymérase et de l'eau pour compléter jusqu'à 50 µL (26,7µl).

Des témoins sans ADN sont réalisés pour tester la présence d'éventuelles contaminations dans les réactifs et les tampons. Les PCR sont effectuées avec un thermocycleur Perkin Elmer Applied Biosystems : GenAmp PCR system 9700 ou 2400.



### Application aux ITS

Les régions ITS de l'ADNr nucléaire ont été amplifiées par PCR à l'aide d'une paire d'amorce spécifique des champignons : ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3') et ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), (White *et al.*, 1990 ; Gardes et Bruns, 1993). Les températures et temps appliqués à la réaction de PCR et notamment aux 30 cycles d'amplification sont présentés Figure 1.

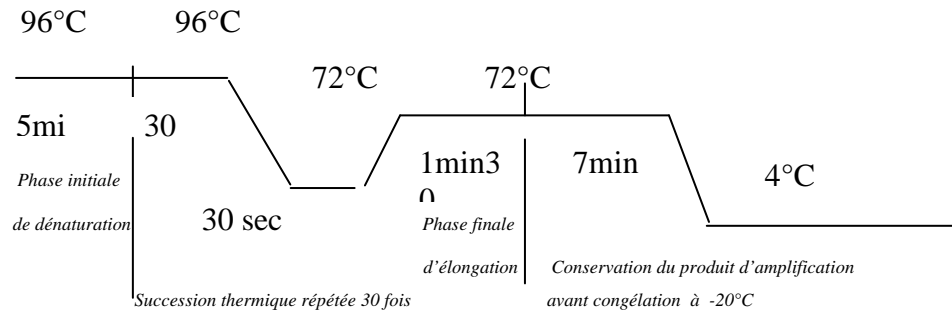


Figure 1 : Températures et temps appliqués aux différentes phases du programme de PCR appliqué à l'amplification des ITS de champignons.

### Purification sur gel des fragments d'ADN

Les produits de PCR obtenus appelés amplifiats sont purifiés de la façon suivante : on dépose 25 µl d'amplifiats mélangés avec 8 µl de bleu de charge (glycérol 30 %, bleu de bromophénol 0,25 %, EDTA 10mM, à pH 8) dans les puits d'un gel d'agarose à 1 % contenant 2 gouttes de bromure d'éthidium (BET) à 0,5 µg/ml.

La migration s'effectue sous une tension de 120 Volts pendant 30 min dans un tampon d'électrophorèse TAE 1X. Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le Smart Ladder (Eurogentec). Il permet d'estimer la taille et la concentration des amplifiats.

Les bandes d'acides nucléiques marquées au BET sont alors visualisées sous UV. En effet, le BET comporte un groupement qui s'intercale entre les plans de bases successives des chaînes polynucléotidiques et la fluorescence à 590 nm de l'ADN plus intense pour le groupement intercalé permet sa visualisation.

### Purification des fragments d'ADN sur gel

Après migration sur gel d'agarose, les bandes à séquencer sont découpées sous UV au scalpel et chaque bande découpée est placée dans un tube Eppendorf de 1,5 ml. Puis les fragments d'ADN sont extraits puis purifiés à l'aide du kit Qiaquick Gel extraction (Qiagen, France).

Trois volumes de solution QG pour 1 volume (masse) de fragment de gel sont ajoutés (le poids en mg correspond à 1 volume de gel). Les tubes sont mis à incuber au bain marie à 50°C pendant 10 min. Ils sont vortexés 2 à 3 fois pendant l'incubation pour mieux dissoudre le gel.

Le tampon QG contient un indicateur coloré de pH. Il faut vérifier que la couleur du mélange soit jaune car l'absorption de l'ADN sur la membrane est efficace seulement à pH<7,5.

Un volume d'isopropanol pur est ajouté pour augmenter le rendement de la purification puis vortexé. Le mélange est transféré dans une colonne QIAquick spin puis centrifugé 1 min à 14000 rpm. L'ADN s'adsorbe sur la colonne. Le filtrat est jeté.

Cinq cents µl de tampon QG sont ajoutés et centrifugés 1 min à 14000 rpm pour éliminer toutes traces d'agarose. Le filtrat est jeté.

Sept cent cinquante µl de solution PE sont ajoutés et centrifugés 1 min à 14000 rpm, le filtrat est jeté. On recommence cette étape, mais avec 250 µl de solution PE. Le tampon PE, contenant de l'éthanol, est utilisé pour laver la colonne : les primers, les impuretés (sels, Taq polymérase, agarose, nucléotides non incorporés, le BET) sont éliminés.

La colonne est séchée en centrifugeant 1 min à 14000 rpm ce qui permet d'éliminer la solution PE qui pourrait interférer dans les étapes suivantes.

La colonne est transférée sur un nouveau tube Eppendorf de 1,5 ml. L'ADN est élué avec 30 µl de solution d'éluion EB après une incubation de 1 min à température ambiante et une centrifugation de 2 min à 14000 rpm. L'ADN est au fond du tube et est conservé à -20°C.

La concentration d'ADN de l'extrait est quantifiée (5 µl d'extrait déposés avec 5 µl de bleu de charge) par comparaison des bandes avec le marqueur (5 µl de Smart Ladder) par migration sur gel d'agarose 1 % (120 Volts pendant 20 min). Cette quantification permettra ultérieurement d'ajuster la concentration d'ADN pour la réaction de séquence.

#### **4.2.5. Séquençage**

La concentration d'ADN de l'extrait est quantifiée à l'aide du Nano Drop.

Les échantillons sont ensuite envoyés pour le séquençage à la société Macrogen, en Corée du Sud.

Dans notre étude, après avoir obtenu et corrigé les séquences à partir de l'interprétation des électrophorégrammes avec le logiciel Sequence Navigator puis, après les avoir assemblées avec le logiciel Autoassembleur (front et reverse), nous effectuerons des BLASTn (Nucléotide) sur internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) pour comparer nos séquences avec celles présentes en banques.

#### **4.2.6. Les critères de ressemblance : Analyse des séquences par comparaison avec les banques de données – BLAST**

*Le BLAST, Basic Local Alignment and Search Tool*, (Altschul *et al.*, 1997) est une méthode spécialement développée pour confronter une séquence nucléique ou protéique inconnue à l'ensemble de celles que l'on trouve dans les banques nucléiques (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Les programmes de comparaison de séquences ont pour but de repérer les endroits où se trouvent des régions identiques ou très proches entre deux séquences et d'en déduire celles qui sont significatives et qui correspondent à un sens biologique de celles qui sont observées par hasard. BLAST détecte de courts segments (onze nucléotides identiques ou deux tripeptides similaires) qui sont localement homologues à la séquence inconnue (Altschul *et al.*, 1997).

À un alignement donné est toujours associé un score. Les programmes d'alignement, quels qu'ils soient, cherchent toujours à maximiser ce score. Nous pouvons penser que plus le score est grand, plus l'alignement est significatif. Ce raisonnement est valide si l'on s'intéresse à une famille homogène où toutes les séquences ont à peu près la même longueur : dans ce cas plus le score est élevé, plus la ressemblance est grande, ce qui ne nous dit pas cependant si elle est significative (Risler *et al.*, 2003). Dans notre étude, plutôt que d'utiliser les scores nous allons utiliser les pourcentages d'identités ou de similarités entre deux séquences et nos critères de vraisemblance seront les suivants : si les séquences les plus proches extraites des

banques de données possèdent plus de 90% de similarité et si ces séquences donnent le même nom de genre et d'espèce, le résultat obtenu est conforme à notre identification initiale basée sur les critères morpho-anatomiques pour le genre et pour l'espèce.

### **Constitution d'un fichier de séquences de référence**

Lors de la réalisation des BLAST, toutes les séquences de référence proches de nos souches seront extraites des banques de données NCBI. Elles constitueront ainsi une source de séquences de référence, outil essentiel pour nos futures études taxonomiques et phylogénétiques.

## **5. Résultats**

### **5.1. Extraction des ADN totaux.**

Les trois protocoles d'extraction de l'ADN (Cf. Annexe 1) réalisés sur les échantillons ont montré les résultats suivants :

- **Le premier protocole** mis en place par le Quéré et *al*, 2002 : 70% des échantillons présentent des culots très pigmentés souvent le culot est brun foncé. Cela semble indiquer la présence de protéines et de diverses substances non solubles comme les tanins, polyphénols, etc.... Et, ces composants peuvent biaiser la PCR par l'inhibition de la Taq polymérase.
- **Le deuxième protocole** utilisant les trois broyages successifs : 60% des échantillons présentent des culots pigmentés, en brun foncé.
- **Le troisième protocole** réalisé à partir du kit Invitrogen est plus rapide : 2 heures au lieu de 5 heures+ une nuit pour les deux autres. Cette méthode permet d'obtenir un culot clair et sans pigments.

La concentration et la pureté des ADN totaux extraits ont tous été évaluées. Les quantités d'ADN obtenues varient en fonction des échantillons. Le Tableau 2 présente la concentration en ADN exprimée en ng/μL.

Tableau 2 : Concentration en ADN exprimée en ng/μL.

<b>Echantillons et Origine</b>	<b>Concentration en ADN (ng/μL)</b>
DIV : III Block 53 2 Maret 2010	59,9
DIV : III Block 53 2 Maret 2010	59,3
DIV : III Block 53 20-03-10 (1)	31,6
DIV : III Block 53 20-03-10 (2)	28,2
DIV : III Block 42	20,3
DIV : III Block 42 2 Maret 2010	11
DIV II Block 38 2 Maret 2010	18
DIV II Block 38 20-03-2010 (1)	35,9
DIV II Block 38 20-03-2010 (2)	24,3
DIV III Block 58 20-03-2010 (1)	198,3
DIV III Block 58 20-03-2010 (2)	67,4
DIV III Block 39 20-03-2010 (1)	41,1

DIV III Blok 39 20-03-2010 (2)	86,9
DIV III Blok 39 20-03-2010 (3)	168,2
DIV III Blok 39 20-03-2010 (4)	45
DIV II Blok 43	69
DIV II Blok 43	48,2
DIV II Blok 43 20-03-2010 (1)	31,1
DIV II Blok 43 20-03-2010 (2)	37,5
DIV II Blok 43 20-03-2010 (3)	34,1
DIV II Blok 43 20-03-2010 (4)	20,9
86200 (1)	87,2
86200 (2)	34,7
86200 (3)	39,8
84200 (1)	47,3
84200 (2)	14,9
84200 (3)	32,8
88200 (1)	48,3
88200 (2)	27,9
88200 (3)	36,1
85200 (1)	27,4
85200 (2)	15,7
85200 (3)	51,7
DIV : III Blok 44	59,9
DIV : III Blok 44	59,3
DIV : III Blok 44	31,6
DIV : III Blok 44 20-03-2010 (1)	28,2
DIV : III Blok 44 20-03-2010 (2)	20,3
DIV : III Blok 44 20-03-2010 (3)	11
DIV : III Blok 44 20-03-2010 (4)	18
DIV : III Blok 44 20-03-2010 )	35,9
	24,3
I 5	68
I 7	29,5
I 8	91,6
I 9	14,5
I 10	19,6
I 13	55,8
I 15	1,7
I 16	23
I 21	28
I 22	38,2
I 24	14,9
I 25	29,2
I 28	50,9
I 29	10,1
I 30	30,7
I 31	8,9
I 32	16,7
I 35	32
I 39	34,2

I 41	14,3
I 43	9,7
I 45	11,4
I 47	29,8
I 48	18,2
I 49	15,2
I 50	16,6
I 51	59,7
I 52	52,8
I 53	77,6
I 54	35
I 56	19,2
I 57	9,6
I 58	18,4
I 60	36,3
I 62	103,4
I 63	179,2
I 65	25,8
I 73	26,6
I 75	9,1
I 80	25,4
H70/11 TSSR	47,8
H50/3 TSS H/R	9,7
R SS P3 B1	11,4
G 12	29,8
G 13	18,2
B 1	15,2
NJ	16,6
NJ 2	59,7
D	52,8
D 511	77,6
P	35
264 03Maret 2010	19,2
Mono G	9,6
85200 USR 1 Steem Tss	18,4
33	36,3

## 5.2. Amplification des ITS

Le premier protocole d'extraction de l'ADN total a permis une amplification optimale pour 57% des échantillons étudiés.

Les 43% restant ont pu être amplifiés en suivant le deuxième protocole d'extraction de l'ADN total qui utilise trois broyages différents.

En revanche, la troisième méthode d'extraction semble la plus concluante de par sa rapidité d'exécution et de l'élimination d'artéfacts (polyphénols, tanins, pigments, etc...) qui facilite

bien la réaction de la PCR. De plus cette méthode d'extraction a permis d'amplifier l'ADN de deux échantillons n'ayant pas donné de résultats avec les deux autres méthodes.

Tous les échantillons ont subi une PCR au 100<sup>ème</sup>. La dilution réduit la présence d'éventuelles impuretés inhibant certaines réactions spécifiques de la Taq polymérase (hybridation optimale des amorces ITS1 et ITS4). Cette dilution entraîne donc une spécificité plus élevée de la Taq polymérase, permettant ainsi d'obtenir de meilleurs résultats.

Le protocole d'amplification est très bien adapté à l'ITS des échantillons, des basidiomycètes. Nous avons obtenu pour tous ces échantillons une bande d'un poids moléculaire compris entre 400 et 900 pb. Sur le gel d'électrophorèse, on visualise toujours une seule bande. Ceci confirme la spécificité des amorces ITS 1 et ITS 4 pour les champignons.

### 5.3. Analyse des séquences par comparaison avec les banques de données – BLAST

Les comparaisons des séquences obtenues par BLASTn des échantillons lyophilisés sont présentées dans le tableau 3.

Dans ce tableau figurent la référence de la souche étudiée et l'identité de la souche après BLASTn (genre et espèce) de la séquence la plus proche.

Tableau 3 : Résultat de la recherche de similarité des séquences nucléotidiques qui ont donné la même espèce et le même genre de champignon pour la séquence la plus proche.

Référence de l'échantillon et Origine	Identité de la souche après BLASTn
DIV : III Block 53 2 Maret 2010	<i>Ganoderma aff. steyaertanum</i>
DIV : III Block 53 2 Maret 2010	indéterminé
DIV : III Block 53 20-03-10 (1)	<i>Ganoderma aff. steyaertanum</i>
DIV : III Block 53 20-03-10 (2)	<i>Ganoderma aff. steyaertanum</i>
DIV : III Block 42	<i>Ganoderma sp.</i>
DIV : III Block 42 2 Maret 2010	<i>G. boninense</i>
DIV II Block 38 2 Maret 2010	<i>Ganoderma sp.</i>
DIV II Block 38 20-03-2010 (1)	<i>Ganoderma aff. steyaertanum</i>
DIV II Block 38 20-03-2010 (2)	<i>Ganoderma aff. steyaertanum</i>
DIV III Block 58 20-03-2010 (1)	<i>G. boninense</i>
DIV III Block 58 20-03-2010 (2)	<i>Ganoderma aff. steyaertanum</i>
DIV III Block 39 20-03-2010 (1)	<i>Ganoderma aff. steyaertanum</i>
DIV III Block 39 20-03-2010 (2)	<i>Ganoderma aff. steyaertanum</i>
DIV III Block 39 20-03-2010 (3)	<i>Ganoderma aff. steyaertanum</i>
DIV III Block 39 20-03-2010 (4)	<i>Ganoderma aff. steyaertanum</i>
DIV II Blok 43	<i>Penicillium commune</i>
DIV II Blok 43	<i>Ganoderma aff. steyaertanum</i>
DIV II Blok 43 20-03-2010 (1)	indéterminé
DIV II Blok 43 20-03-2010 (2)	indéterminé
DIV II Blok 43 20-03-2010 (3)	indéterminé
DIV II Blok 43 20-03-2010 (4)	indéterminé
86200 (1)	<i>G. boninense</i>
86200 (2)	indéterminé
86200 (3)	indéterminé

84200 (1)	<i>G. boninense</i>
84200 (2)	<i>G. boninense</i>
84200 (3)	<i>G. boninense</i>
88200 (1)	<i>Ganoderma</i> sp.
88200 (2)	<i>G. boninense</i>
88200 (3)	<i>Ganoderma</i> sp.
85200 (1)	<i>G. boninense</i>
85200 (2)	<i>Antrodia malicola</i>
85200 (3)	indéterminé
DIV : III Blok 44	<i>Ganoderma</i> aff. <i>steyaertanum</i>
DIV : III Blok 44	<i>Ganoderma</i> sp.
DIV : III Blok 44	indéterminé
DIV : III Blok 44 20-03-2010 (1)	indéterminé
DIV : III Blok 44 20-03-2010 (2)	indéterminé
DIV : III Blok 44 20-03-2010 (3)	<i>Alternaria tenuissima</i>
DIV : III Blok 44 20-03-2010 (4)	<i>Ganoderma</i> aff. <i>steyaertanum</i>
DIV : III Blok 44 20-03-2010 )	<i>Ganoderma</i> aff. <i>steyaertanum</i>
I 5	<i>Ganoderma boninense</i>
I 7	<i>Ganoderma boninense</i>
I 8	<i>Ganoderma</i> aff. <i>steyaertanum</i>
I 9	<i>Ganoderma boninense</i>
I 10	<i>Ganoderma boninense</i>
I 13	<i>Ganoderma boninense</i>
I 15	<i>Ganoderma</i> aff. <i>steyaertanum</i>
I 16	<i>Ganoderma boninense</i>
I 21	indéterminé
I 22	<i>Ganoderma</i> aff. <i>steyaertanum</i>
I 24	indéterminé
I 25	<i>Ganoderma</i> aff. <i>steyaertanum</i>
I 28	indéterminé
I 29	<i>Ganoderma</i> sp.
I 30	<i>Ganoderma</i> aff. <i>steyaertanum</i>
I 31	<i>Ganoderma</i> sp.
I 32	<i>Ganoderma boninense</i>
I 35	indéterminé
I 39	<i>Ganoderma boninense</i>
I 41	<i>Ganoderma</i> sp.
I 43	<i>Ganoderma lucidum</i> strain
I 45	indéterminé
I 47	indéterminé
I 48	<i>Ganoderma lucidum</i> strain
I 49	<i>Ganoderma boninense</i>
I 50	<i>Ganoderma</i> aff. <i>steyaertanum</i>
I 51	<i>Ganoderma</i> aff. <i>steyaertanum</i>
I 52	<i>Ganoderma</i> aff. <i>steyaertanum</i>
I 53	<i>Ganoderma</i> sp.
I 54	<i>Ganoderma</i> sp.

I 56	<i>Ganoderma sp.</i>
I 57	<i>Ganoderma sp.</i>
I 58	<i>Ganoderma sp.</i>
I 60	<i>indéterminé</i>
I 62	<i>Ganoderma sp.</i>
I 63	<i>Ganoderma sp.</i>
I 65	<i>indéterminé</i>
I 73	<i>Ganoderma sp.</i>
I 75	<i>Ganoderma ramosissimum</i>
I 80	<i>Ganoderma sp.</i>
H70/11 TSSR	<i>indéterminé</i>
H50/3 TSS H/R	<i>indéterminé</i>
R SS P3 B1	<i>indéterminé</i>
G 12	<i>Ganoderma sp.</i>
G 13	<i>Ganoderma boninense</i>
B 1	<i>Ganoderma boninense</i>
NJ	<i>Ganoderma boninense</i>
NJ 2	<i>Ganoderma boninense</i>
D	<i>Ganoderma boninense</i>
D 511	<i>indéterminé</i>
P	<i>Ganoderma boninense</i>
264 03Maret 2010	<i>Ganoderma sp.</i>
Mono G	<i>Ganoderma sp.</i>
85200 USR 1 Steem Tss	<i>Ganoderma sp.</i>
33	<i>Ganoderma boninense</i>

- Pour 76 % des échantillons les BLAST ont révélé le nom du genre du champignon attendu et conforme à notre identification initiale selon les critères morpho-anatomiques pour le genre *Ganoderma* : 25 *Ganoderma Boninense* ; 22 *Ganoderma aff. Steyaertanum*; 2 *Ganoderma lucidum* et 1 *Ganoderma ramosissimum*.

- Pour 3% des échantillons, les BLAST révèlent des contaminants des genres *Penicillium*, *Alternaria* et *Antrodia* qui appartiennent successivement à la classe des Ascomycètes et des Basidiomycètes.

- Les 21% des échantillons restants ne donnent pas de réponse par BLAST.

Ces 24% des échantillons qui n'ont pas donné de résultats significatifs vont être réévaluées dans la prochaine analyse de 2011.

## 6. Conclusion

Afin de caractériser les souches qui infestent le palmier à huile, nous avons développé une méthode rapide et discriminante basée sur l'analyse de la diversité de séquences partielles d'ADN ribosomique indépendamment au recours aux caractères morphologiques macro- et microscopiques des sporophores nécessaires à l'identification des genres et espèces.



L'adaptation du protocole mis en place au CIRAD, nous a permis d'extraire les ADN de tous nos échantillons à partir de quelques mg de mycélium ; extraits d'ADN qui nous ont permis d'obtenir, avec la plupart des souches étudiées, un amplifiat d'ITS d'une taille variant de 400 à 900 paires de bases.

L'analyse par BLASTn des séquences obtenues du fragment ITS1/ITS4 à partir de 88 échantillons permet de caractériser ces souches. L'utilisation de ce fragment présente plusieurs avantages notamment la bonne reproductibilité d'obtention des séquences et l'existence d'une importante quantité de séquences en banque de données. La variabilité de ce fragment, en particulier pour les régions ITS1 et 5,8S, est souvent suffisante, mais toujours dépendante de la qualité des séquences de la banque, pour caractériser le niveau taxonomique du genre et de l'espèce de la souche.

Sous réserve de vérification de la base des séquences utilisées pour le BLASTn, cette méthode donne des indications taxinomiques pour des souches ou des mycéliums pour lesquels aucune autre caractéristique n'est disponible.

## **7. Evolutions du projet et perspectives**

- Au vu des résultats actuels, la variation chez les ITS1 et ITS2 sera observée au sein du genre *Ganoderma* et des analyses des processus évolutifs vont être abordées.
- Des études sur l'intraspecificité du *Ganoderma* prélevé dans les tissus de palmiers provenant d'origine géographique différente (sites, localités), d'âges différents (de 0 à 25 ans), et de générations différentes vont être également évaluées.
- La poursuite de ces travaux devra aboutir aux outils suivants :
  - de cartographie et de caractérisation de la biodiversité globale et mondiale des champignons responsables des maladies des palmiers à huile,
  - d'étude phylogénétique globale afin d'analyser la corrélation entre les données génétiques et les informations disponibles sur l'origine des souches
  - d'aide au diagnostic des champignons responsables des maladies des palmiers à huile,
  - de quantification et d'évaluation de l'activité de ces champignons,

## Annexe 1 : Protocoles mis en place pour l'extraction des ADN totaux

### Premier protocole :

Le protocole utilisé pour l'extraction de l'ADN est celui mis en place par Le Quéré *et al.* en 2002, à partir d'une méthode développée par Wöstemeyer en 1985.

- 1- Les échantillons sont broyés dans un mortier avec 1 ml le tampon\* d'extraction préparé extemporanément puis placés dans des tubes Eppendorf stériles qui vont être incubés pendant 30 minutes à 55°C dans un bain-marie. Puis ils sont vortexés et incubés pendant 1 heure dans une étuve à 37°C.
- 2- Une fois l'incubation terminée, on ajoute dans les tubes 250µl de NaCl à 5M et 110µl de cetyltriméthylammonium (CTAB) à 10%. Les tubes sont vortexés et incubés au bain marie à 65°C pendant 10 minutes. Cette étape permet de détruire les membranes et d'éclater les noyaux des cellules par lyse chimique pour libérer l'ADN et d'autres composés cellulaires.
- 3- Les échantillons sont placés dans la glace pendant 30 minutes puis centrifugés 30 minutes à 5000 rpm pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est placé dans un tube froid de 1,5ml préalablement placé dans de la glace.
- 4- On ajoute 550µl d'isopropanol pour précipiter l'ADN. Les tubes sont centrifugés pendant 20 minutes à 14000 rpm, puis le surnageant est éliminé.
- 5- 300µl d'éthanol sont introduits afin de laver le culot contenant de l'ADN et les tubes sont centrifugés à 13000 rpm durant 5 minutes. Le surnageant est éliminé et les tubes sont placés, ouverts, sous la hotte à extraction afin de faire évaporer les vapeurs d'alcools.
- 6- 50µl de TE buffer sont ajoutés pour dissoudre le culot (1mM d'EDTA, 10mM de tris-HCl pH8) : les tubes sont laissés une nuit à 4°C pour faciliter la dissolution.

\*Composition du tampon d'extraction préparé extemporanément :

- 100 mM de Tris-HCL (pH 8)
- 100 mM d'EDTA
- 2% de SDS
- 1% de β-mercaptoéthanol
- 100 µg/ml de Proteinase K

### Deuxième protocole :

Ce protocole utilise trois étapes de « broyages successifs » pour augmenter la quantité de cellule éclatée et ainsi libérer une plus grande quantité d'ADN. Les trois étapes se font scrupuleusement de la manière suivante :

Première étape : Réalisation d'un choc thermique : les tubes contenant les échantillons sont placés dans de l'azote liquide pendant 2 à 3 minutes pour que la congélation soit complète, ensuite les tubes sont mis sur une plaque chauffante à 95-100°C pendant 3 minutes, cette étape est répétée trois fois ;

Deuxième étape : Réalisation d'une lyse chimique : 1 à 2ml de tampon d'extraction utilisé dans le premier protocole, sont ajoutés dans les tubes ;

Troisième étape : Réalisation d'une lyse mécanique : trois billes de métal sont ajoutées dans les tubes en utilisant un broyeur à bille.

Une fois ces trois étapes de broyage réalisées, le protocole se poursuit comme au premier protocole, c'est-à-dire à partir de l'incubation des tubes pendant 30 minutes à 55°C.

**Le troisième protocole utilisé pour l'extraction de l'ADN** est réalisé avec un kit d'extraction d'Invitrogen™ purlink™ plant total DNA purification kit.

Les étapes pour la préparation du lysat végétal sont les suivantes :

1. Pour les tissus végétaux durs, congeler les tissus dans l'azote liquide et broyer le tissu pour obtenir une poudre.
2. Ajouter 250µl de tampon de suspension (R2) qui est à température ambiante.
3. Homogénéiser la solution au vortex.
4. Ajouter 15 µl de SDS 20% et 15 µl de RNase A (20mg/ml) pour obtenir le lysat.
5. Incuber à 55°C pendant 15 minutes pour compléter la lyse.
6. Centrifuger le lysat à 10000 rpm pendant 5 minutes pour éliminer le matériel insoluble.
7. Transférer le surnageant dans un tube stérile de 1,5ml sans remuer le culot.

## Suite Annexe 1

8. Ajouter 100µl de tampon de précipitation (N2) dans le lysat. Mélanger au vortex et incubé dans de la glace pendant 5 minutes.  
Cette étape permet de précipiter les protéines et les polysaccharides et tous les pigments photosynthétiques liés aux protéines sont également précipités. Les pigments peuvent tâcher les cartouches Purelink™ et donner un éluat coloré.
9. Centrifuger à 15000 rpm pendant 5 minutes à température ambiante pour avoir un lysat clair. Note : le surnageant doit être clair et non visqueux après cette étape de précipitation.
10. Transférer 250µl du lysat dans un tube stérile de 1,5 ml et ajouter au lysat 375µl de tampon de liaison (B4) contenant de l'éthanol. Bien mélanger au vortex.
11. Procéder à la fixation de l'ADN.

### Fixation de l'ADN :

1. Transvaser la solution de l'étape 10 dans une colonne mise sur un tube 2ml fourni dans le kit et centrifuger à 10000 rpm pendant 30 secondes à température ambiante.
2. Jeter le tube 2 ml avec le filtrat et placer la colonne sur un tube 2 ml propre fourni dans le kit.

### Lavage de l'ADN :

1. Ajouter dans la colonne 500 µl de tampon de lavage (W4)
2. Centrifuger à 10000 rpm pendant 30 secondes à température ambiante. Enlever le filtrat et remettre la colonne dans le tube 2 ml.
3. Ajouter dans la colonne 500 µl de tampon de lavage (W5) contenant de l'éthanol.
4. Centrifuger à 10000 rpm pendant 30 secondes à température ambiante. Enlever le filtrat et remettre la colonne dans le tube 2ml.
5. Répéter les étapes 3 et 4 une fois de plus.
6. Centrifuger à 15000 rpm pendant 2 minutes pour éliminer tout résidu de tampon de lavage (W5) à température ambiante. Jeter le tube 2 ml.
7. Procéder à l'élution de l'ADN.  
Elution d'ADN :
  1. Placer la colonne dans un tube stérile 1,5 ml.
  2. Ajouter 100 µl de tampon d'élution (E1) ou de l'eau distillé (pH>7).
  3. Incuber à température ambiante pendant 1 minute puis centrifuger à 15000 rpm pendant 1 minute. Le tube contient alors l'ADN purifié.
  4. Pour récupérer plus d'ADN, réaliser une deuxième étape d'élution en utilisant 100 µl de tampon d'élution (E1) ou de l'eau distillée. La deuxième élution peut être effectué en utilisant le même tube d'élution ou dans un tube différent.
  5. Centrifuger la colonne à 15000 rpm pendant 1 minute à température ambiante.  
Le tube contient alors l'ADN purifié. Retirer et jeter la colonne.
  6. Les tubes sont ensuite conservés au congélateur à -20°C pour éviter toute dégradation de l'ADN.

## Deuxième Partie

**Les principaux travaux et les principales dépenses engagées ont été les suivants:**

- encadrement et rémunération de stagiaires (6mois)
- achat de petits matériels (hotte, congélateur, perceuse, etc.), de consommables (kits de biologie moléculaire, pipettes, consommables de laboratoire, etc.,), de bibliographie
- analyses moléculaires de 111 échantillons lyophilisés issus de fructifications fongiques et de tissus infestés de *Ganoderma* provenant d'Indonésie.
- constitution d'une banque de 250 séquences du genre *Ganoderma*
- missions en Europe concernant la caractérisation et la biodiversité fongique.
- mission réalisée en Indonésie du 25/09 au 3/10 dans les plantations de la SOCFINDO à Tanah Gambus. Cette mission a consisté à collecter des tissus frais de palmier à huile et des fructifications fongiques de *Ganoderma* (Cf. Tableau 4). Les collectes ont pu être réalisées à partir des dégradations observées sur le terrain et, également, ceux présents dans le proche environnement (carpophore, mycélium, tissus infestés) ou ceux encore ne provoquant pas de symptômes sur plusieurs années (des palmiers d'aspect sain mais porteurs ou non porteurs de carpophores).

**Tableau 4 : Echantillons d'Indonésie-Missions septembre 2010**

GROUP AGE OF PLANTING YEARS	DAY - 1			DAY - 2		
	BACKHOE LOADER	CHAINSAW	FRUITING BODY	BACKHOE LOADER	CHAINSAW	FRUITING BODY
	BLOCK (PLANTING YEARS)					
<b>0 - 5</b>				27 (2005)		
<b>6 - 10</b>	18 (2001)	13 A (2003)		7 A (2004)		
<b>11 - 15</b>		54 (1999)	23 (1996), 34 (1998), 54 (1999), 55 (1999),	43 (1996), 44 A (1996)	53 A (1997), 59 (1998)	
<b>16 - 20</b>		24 (1990)				41 A (1985), 57 (1986), 62 (1986), 65 (1988), 69 (1989)

## Références

Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. et Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-402.

Gardes M., Muller G.M., Fortin J.A. et Kropp B.R. 1991. Mitochondrial DNA polymorphisms in *Laccaria bicolor*, *L. laccata*, *L. proxima* and *L. amethystina*. *Mycol. Res.* **95**:206-216.

Gardes M. et Bruns T. 1993. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* **2**:113-118.

Risler J.L., Louis A., Mohsenizadeh S., Brezellec P. et Diaz-Lazcoz Y. 2003. Les comparaisons massives de séquences. Laboratoire Génome et Informatique. Document : 23pp.

White T.J., Bruns T., Lee S. et Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Dans : PCR protocols: a Guide to Methods and Applications, (eds.) Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. et White T.J. Academic Press Inc., San Diego, Californie, 315-322.